Thymune*-T FR

1. DOMAINE D'APPLICATION

Le test Thymune*-T est destiné à la mesure semi-quantitative des auto-anticorps anti-thyroglobuline humaine (auto-anticorps de la thyroïde).

2. RESUME ET EXPLICATION DU TEST

Ce test est basé sur l'hémagglutination passive de Boyden et sur les travaux de Witebsky et Rose[8]. Des hématies recouvertes avec de la thyroglobuline humaine sont agglutinées par un auto-anticorps spécifique formant ainsi un tapis au fond de la cupule; en cas d'absence d'agglutination, les hématies se rassemblent en un bouton ou un anneau étroit. Depuis la mise en évidence d'anticorps contre la thyroglobuline dans le sérum de patients atteints de la maladie de Hashimoto[6,9], il a été établi que des auto-anticorps dirigés contre plusieurs constituants de la thyroïde[1,4] sont associés avec les lésions inflammatoires destructives de la glande thyroïdienne. Les anticorps contre deux de ces constituants appelés thyroglobuline et antigène microsomal, ont une importance particulière dans le diagnostic[3,5,7].

3. PRINCIPE DE LA METHODE

Les protéines telles que la thyroglobuline sont facilement fixées sur la surface de globules rouges qui ont été traités par l'acide tannique. La thyroglobuline est extraite de glandes thyroïdes humaines par des techniques de précipitation saline classique, puis fixée à la surface de globules rouges de dinde tannés ; ceci donnera un réactif suffisamment sensible pour détecter les taux bas d'anticorps contre la thyroglobuline. Très peu de sérums humains réagissent directement envers les hématies de dinde, provoquant une agglutination non-spécifique des hématies sensibilisées. Ces réactions non-spécifiques peuvent être détectées à l'aide d'hématies contrôle non sensibilisées. Les hématies test et les hématies contrôle sont traitées par du formalin et lyophilisées pour permettre une bonne conservation.

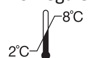
4. REACTIFS

COMPOSITION DU COFFRET

1.	Hématies test	5 flacons (bouchons blancs)
2.	Hématies contrôle	1 flacon (bouchon blanc)
3.	Diluant	2 flacons (bouchons blancs)
4.	Sérum contrôle positif	1 flacon (bouchon rouge)
5.	Sérum contrôle négatif	1 flacon (bouchon bleu)
6.	Mode d'emploi	1

5. DESCRIPTION DES REACTIFS, PREPARATION POUR UTILISATION ET CONDITIONS DE CONSERVATION RECOMMANDEES

Voir également **Précautions et restrictions d'emploi**.



Avant reconstitution, les réactifs doivent être conservés entre 2 et 8°C pour leur permettre de conserver leurs propriétés actives au moins jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'emballage.

Les hématies test et les hématies contrôle doivent être reconstituées avec 3 ml d'eau distillée selon la méthode suivante : tapoter le flacon sur la paillasse afin d'éliminer toutes les substances adhérant au bouchon en caoutchouc. Retirer avec précaution la capsule et le bouchon en caoutchouc puis ajouter 3 ml d'eau distillée. Remettre le bouchon en place et agiter pour faciliter la dispersion du réactif. Laisser reposer le flacon jusqu'à obtention d'une dispersion complète puis retourner le flacon et remuer à nouveau pour obtenir un mélange homogène. Pour des performances optimales, les hématies doivent être reconstituées au moins 30 minutes avant utilisation.

Une fois reconstituées, les suspensions d'hématies restent stables entre 2 et 8°C pendant 5 jours. Pour une conservation plus longue des hématies test (jusqu'à un mois), les suspensions d'hématies doivent être congelées entre -15 et -25°C. et ne peuvent être décongelées qu'une fois. Les hématies contrôle peuvent être réparties en aliquotes et congelées pendant 18 mois entre -15 et -25°C. Le diluant et les sérums contrôle peuvent être conservés entre 2 et 8°C. Il est essentiel de prendre un maximum de précautions pour éviter toute contamination bactérienne du diluant et des sérums contrôle durant le test.

TEST CELLS

Hématies test

Chaque flacon d'hématies test contient l'équivalent lyophilisé de 3 ml de suspension d'hématies de dinde à 1% tannées, traitées à l'aldéhyde et recouvertes de thyroglobuline humaine dispersées dans du tampon phosphate salin pH 7,2 contenant 5% de saccharose, 1,5% de sérum normal de lapin et 0,01% de Bronopol.

CONTROL CELLS

Hématies contrôle

Chaque flacon d'hématies contrôle contient l'équivalent lyophilisé de 3 ml de suspension d'hématies de dinde à 1% tannées, traitées à l'aldéhyde, dispersées dans du tampon phosphate salin pH 7,2 contenant 5% de saccharose, 1,5% de sérum normal de lapin et 0,01% de Bronopol.

DILUENT ⚠

Diluent

Chaque flacon contient 25 ml de solution saline isotonique contenant du sérum humain normal, négatif pour les antigènes Hbs et les anticorps anti-VIH 1 et 2 et anti-VHC, du sérum de dinde normal et 0,1% d'azide de sodium. Les volumes de ces constituants sont ajustés pour donner des résultats optimaux avec chaque lot d'hématies sensibilisées et les composants d'un coffret ne doivent pas être mélangés avec ceux d'un autre.

CONTROL +

Sérum contrôle positif

Chaque flacon contient 1 ml de sérum de mouton anti-thyroglobuline ayant un titre hémagglutinant d'environ 1/640 avec les hématies test. Aucune agglutination des hématies contrôle ne doit se manifester lors des dilutions. Le sérum contient 0,1% d'azide de sodium.



Sérum contrôle négatif

Chaque flacon contient 1 ml de sérum humain normal négatif pour les antigènes HBs et les anticorps anti-VIH 1, 2 et anti-VHC qui ne doit pas agglutiner les hématies test ou contrôle, à aucune dilution. Le sérum contient aussi 0,1% d'azide de sodium.

6. PRECAUTIONS ET RESTRICTIONS D'EMPLOI

IVD

Réservé exclusivement au diagnostic *in vitro*.

Réservé uniquement à un usage professionnel.

Pour de plus amples informations sur les composants potentiellement dangereux, se référer à la fiche de sécurité fournie par le fabricant et à l'étiquetage.

INFORMATIONS DE SECURITE

ATTENTION : Ce coffret contient des composants d'origine humaine. Aucun test actuel ne peut garantir que les produits issus de liquides biologiques humains ne transmettront pas d'infection. Par conséquent, tout le matériel d'origine humaine devra être considéré comme potentiellement infectieux. Il est recommandé que tous les réactifs et échantillons d'origine humaine soient manipulés avec les précautions d'usage selon le Guide de Bonne Exécution des Analyses. Le sérum humain normal utilisé dans la fabrication du diluant et dans le contrôle négatif ont subi un dépistage négatif concernant les antigènes HBs et les anticorps anti-HIV 1 et 2 et anti-VHC.

Le diluant et les sérums contrôle positif et négatif contiennent 0,1% d'azide de sodium, lequel est classifié selon les directives de la Communauté Economique Européenne (CEE) comme nocif (Xn). Les phrases de risque (R) et de sécurité (S) appropriées se trouvent ci-dessous :

Xn



R22	Nocif en cas d'ingestion
R32	Au contact d'un acide, dégage un gaz très toxique
S35	Ne se débarrasser de ce produit et de son récipient qu'en prenant toutes les précautions d'usage
S36	Porter un vêtement de protection approprié
S46	En cas d'ingestion, consulter immédiatement un médecin et lui montrer l'emballage ou l'étiquette.

Noter que les azides peuvent réagir avec le plomb et le cuivre utilisés dans les systèmes de plomberie et pourront former des sels explosifs. Bien que la quantité d'azide utilisée dans ce coffret soit faible, tous les matériaux en contact avec de l'azide doivent être rincés abondamment à l'eau.

PRECAUTIONS D'ANALYSE

1. Ne pas utiliser les réactifs au-delà de la date de péremption indiquée.
2. Avant utilisation, essuyer les plaques de microtitration avec un chiffon propre afin de réduire les interférences statiques.
3. Tous les réactifs et échantillons doivent être à température ambiante (18 à 30°C) avant utilisation. Replacer les réactifs à la température de conservation recommandée immédiatement après utilisation.
4. Tous les tests doivent être effectués à température ambiante (18 à 30°C).
5. Bien que le test puisse être effectué avec des plaques de microtitration à fond en « U » ou en « V », les performances de tous les lots sont confirmées par Remel avec des plaques à fond en « U ». En cas d'utilisation de plaques à fond en « V », il est recommandé à l'utilisateur de se familiariser avec les images de réaction obtenues.
6. Les plaques de microtitration à fond « UV » ne doivent pas être utilisées.
7. Les micropipettes donnent des résultats plus précis et reproductibles que les microdilueurs et doivent être utilisées si possible lors de la titration des échantillons. Si des microdilueurs sont utilisés, bien s'assurer de la précision du volume.

7. PRELEVEMENT ET CONSERVATION DES ECHANTILLONS

Les échantillons de sang prélevés par ponction veineuse doivent coaguler naturellement et les sérums doivent être clarifiés par centrifugation avant le test. S'il est nécessaire de conserver les échantillons avant le test, ils devront être congelés entre –15 et –25°C. Eviter les congélations et décongélations répétées. Tous les échantillons de patients doivent être inactivés par chauffage à 56°C pendant 30 minutes avant le test.

Les échantillons de plasma ne conviennent pas pour ce test.

8. PROCEDURE

MATERIEL FOURNI

Le matériel fourni permet d'effectuer 50 tests. Voir la partie Composition du coffret.

MATERIEL NECESSAIRE MAIS NON FOURNI

Le matériel suivant est nécessaire en plus des matériels normalement disponibles dans les laboratoires.

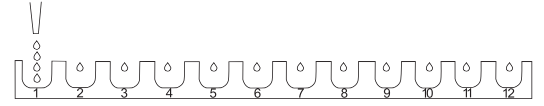
1. Plaques de microtitration en « U » ou « V » jetables.
2. Compte-gouttes de 0,025 ml.
3. Micropipette (à multicanaux) ou microdilueurs de 0,025 ml.

9. PROCEDURE DU TEST

Procedure Thymune*-T

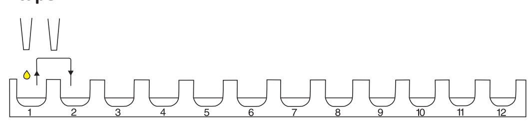
Une rangée complète (cupules 1 à 12) de la plaque de microtitration est nécessaire pour chaque échantillon ou contrôle à tester. Les sérums contrôle négatif et positif doivent être inclus dans chaque série de tests et traités comme des sérums de patients. Les sérums de patients doivent être inactivés par chauffage à 56°C pendant 30 minutes.

Etape 1 :



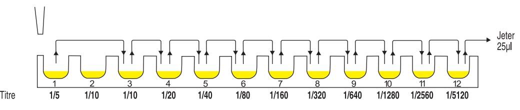
Ajouter 4 gouttes de diluant dans la cupule 1 et une goutte dans les cupules 2 à 12 à l'aide d'un compte-gouttes standard de 0,025 ml.

Etape 2 :



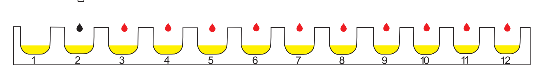
Ajouter 0,025 ml de sérum dans la cupule 1. Mélanger et transférer 0,025 ml dans la cupule 2 a l'aide d'une micropipette ou d'un microdilueur. Celle-ci fournira la cupule de sérum contrôle. Retirer 0,025 ml de la cupule 2.

Etape 3 :



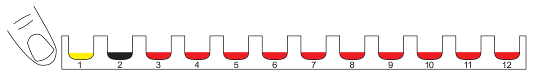
Transférer 0,025 ml de la cupule 1 dans la cupule 3, mélanger et transférer 0,025 ml dans la cupule 4 avec un nouvel embout de micropipette ou un microdilueur. Continuer les dilutions jusqu'à la cupule 12. Retirer 0,025 ml de la cupule.

Etape 4 :



Ajouter immédiatement 0,025 ml d'hématies contrôle dans la cupule 2 et 0,025 ml d'hématies test dans les cupules 3 à 12.

Etape 5 :



Mélanger les contenus sur un agitateur de plaque pendant 30 secondes au minimum ou en tapotant très doucement la plaque sur les quatre côtés.

ATTENTION : Ne pas mélanger correctement ou utiliser un agitateur de plaque trop lent entraînera un résultat avec des images irrégulières et une sensibilité plus faible.

Mettre un couvercle sur la plaque afin d'éviter toute évaporation ou contamination. Laisser la plaque sédimenter à température ambiante (18 à 30°C), à l'abri de la lumière directe et loin de toute vibration. Lire après 30 à 60 minutes.

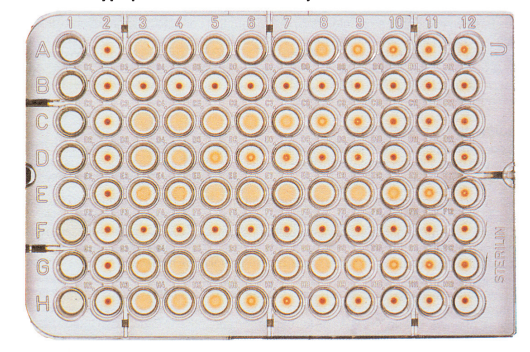
10. RESULTATS

LECTURE DES RESULTATS

Dans un test *positif*, les hématies sensibilisées sont agglutinées par les anticorps et forment un tapis diffus sur le fond des cupules. Dans un test *négatif*, les hématies sédimentent au fond des cupules en un petit cercle ou un bouton compact. Des réactions faiblement positives peuvent donner des images intermédiaires. Le point final doit être lu comme la dilution la plus grande de l'échantillon donnant approximativemet 50% d'agglutination avec les hématies test. Un effet de prozone (une ou plusieurs cupules présentant une agglutination inattendue faible ou négative) est parfois vu sur les dilutions faibles de sérums positifs, prendre garde à ne pas mal interpréter ces résultats.

Si une agglutination complète est encore présente à la dilution finale de 1/5 120, préparer une dilution à 1/100 du sérum dans le diluant fourni et re-titrer la dilution comme un échantillon normal. Si un point final n'est toujours pas obtenu, répéter la titration avec une dilution de départ plus élevée, telle que 1/1 000.

Résultats typiques obtenus avec Thymune*-T



L'illustration montre huit titrations dans des plaques en « U ». Les titrations sont faites en utilisant des micropipettes. La seconde cupule de chaque rangée contient des hématies contrôle avec une dilution à 1/10 de sérum, les cupules 3 à 12 contiennent des dilutions successives de sérum provenant d'une dilution de 1/10 à 1/5 120 avec des hématies test.

Rangée A – Positif 1/320	Rangée E – Positif 1/1 280
Rangée B – Négatif	Rangée F – Négatif
Rangée C – Positif 1/160	Rangée G – Positif 1/640
Rangée D – Positif 1/20-1/40	Rangée H – Positif 1/40

11. CONTROLE QUALITE

La cupule contrôle (colonne 2) doit toujours être négative. Des anticorps hétérophiles anti-dinde sont très rarement rencontrés aux dilutions 1/10 et plus, mais si la cupule contrôle présente une agglutination, le sérum doit être absorbé en mélangeant 0,5 ml de suspension d'hématies contrôle avec 0,1 ml de sérum test. Agiter le mélange, laisser reposer pendant 10 minutes et séparer le sérum absorbé par centrifugation.

Répéter le test en utilisant le sérum absorbé.

Les sérums contrôle positif et négatif sont fournis afin de s'assurer du bon fonctionnement des suspensions d'hématies test et contrôle. Le sérum négatif ne doit pas provoquer d'agglutination quelle que soit la dilution, alors que le sérum positif doit produire une agglutination à la dilution 1/640 (dans les cupules en « U »), plus ou moins une dilution d'écart. Les titres observés dans les cupules en « V » sont généralement légèrement plus élevés. L'absence d'un titre acceptable pour le sérum contrôle positif indique que le test n'a pas une sensibilité correcte et il doit être répété.

Toute réaction non conforme à cette description indiquera une détérioration des hématies contrôle ou test ou une contamination du diluant.

12. INTERPRETATION DES RESULTATS

Les tests d'hémagglutination passive (HA) pour la détection des anticorps anti-thyroglobuline sont environ 1 000 fois plus sensibles que les tests de précipitation, et les patients atteints de la maladie de Hashimoto avec précipités positifs ont donné des titres HA de 640 à plusieurs millions. La combinaison des tests d'hémagglutination de thyroglobuline et d'antigène microsomal détecte pratiquement tous les goitres Hashimoto et environ 90% des cas de myxoedèmes primaires. Les deux tests doivent être pratiqués en parallèle dans tous les cas où il est difficile de distinguer cliniquement une thyroïdite auto-immune d'un autre type de goitre. Une autre application importante des deux tests d'anticorps thyroïdiens est dans le diagnostic différentiel de la thyrotoxicose primaire et certaines variétés de tachycardies, d'états anxieux, de pertes de poids inexpliquées ou de diarrhées. Dans des cas d'exophtalmie unilatérale, les tests aideront à la différenciation entre une étiologie endocrinienne et des lésions orbitales locales, pouvant éviter ainsi des tests beaucoup plus coûteux. Environ 70 à 90% des cas de variantes de la maladie de Graves donnent des résultats positifs en thyroglobuline et/ou antigène microsomal contre 10 à 15% des bien portants, selon l'âge et le sexe.

La plupart des sujets thyrotoxiques présentent des taux relativement bas d'anticorps, environ 20% ont des taux modérés ou élevés (thyroglobuline ≥ 1/640, microsomal ≥ 1/6 400), et ceci indique soit une forme plus sévère de la maladie avec tendance à la rechute, soit une thyroïdite destructive concomitante, prédisposant à un myxoedème post-opératoire ou à une perte de fonction thyroïdienne spontanée quelques années après l'épisode thyrotoxique. De même, une hémagglutination de thyroglobuline en combinaison avec une hémagglutination microsomale permettront de distinguer la thyroïdite atrophique avec hypothyroïdisme moyen ou sévère et les cas de dépression ou obésité dus à d'autres causes. Des résultats positifs dans ces deux tests ne sont pas suffisants pour exclure le cancer de la thyroïde, pas plus que des taux bas (Thyroglobuline <1/160, Microsomal <1/1 600) indiquent nécessairement des lésions thyroïdiennes sévères. Certains cas de « foyers thyroïdiques » restent subcliniques et non progressifs. Si un résultat positif est obtenu, des investigations supplémentaires telles que la scintillation thyroïdienne pour le cancer, la TRH pour l'exploration de la thyroïde et le dosage de la TSH dans le sérum pour déceler la présence d'hypothyroïdisme sont nécessaires, le choix du test dépendant du tableau clinique.

Les hémagglutinations thyroglobuline et microsomale sont très utiles pour prévoir un possible dysfonctionnement thyroïdien chez des patients présentant d'autres désordres endocriniens auto-immuns tels que la maladie d'Addison, les diabètes mellitus insulino-dépendants ou les auto-immunopathies polyendocriniennes et chez les membres de familles prédisposées à des désordres auto-immunitaires spécifiques d'organes.

13. LIMITES DE LA METHODE

Le plasma et le sérum infecté ne sont pas utilisables dans ce test.

14. RESULTATS ATTENDUS

Voir le paragraphe Interprétation des résultats

15. PERFORMANCE DU TEST

Une comparaison de sensibilité du test Thymune*-T avec une technique d'hémagglutination (hématies de mouton) a été faite en testant des sérums de 158 patients atteints soit d'un goitre Hashimoto, soit d'un myxoedème primaire, soit d'une thyrotoxicose. Une bonne corrélation entre les deux systèmes a été trouvée dans une échelle de titres variant entre < 1/10 et > 1/5 120[2].

En testant des sérums provenant d'un panel de donneurs de sang normaux, l'incidence de résultats positifs était de 4% avec des titres 1/20[2].

Les réactifs sont strictement contrôlés pour assurer une bonne reproductibilité entre les lots. Chaque lot d'hématies test est préparé pour réagir vis-à-vis d'un panel de sérums contenant des taux d'anticorps connus avec une tolérance maximale d'une double dilution. La reproductibilité de lot à lot a été évaluée en testant 12 échantillons à trois occasions sur trois lots de réactifs. Chaque échantillon donnait régulièrement le même résultat plus ou moins une double dilution d'écart[2,10].

BIBLIOGRAPHIE

1 **Anderson, J.R., Goudie, R.B.,** *et al* (1959).The 'thyrotoxic' complement-fixation reaction. *Scot. med. J.* **4,** 64.

2 **Cayzer, I., Chalmers, S.R.,** *et al* (1978). An evaluation of two new haemagglutination tests for the rapid diagnosis of autoimmune thyroid desease. *J. Clin. Path.* **31,** 1147.

3 **Doniach, D.** (1975). Humoral and genetic aspects of thyroid autoimmunity. *Clinics in Endocrinology and Metabolism* **4,** Part, 2, p. 267, Irvine, W.J. (ed.).

4 **Doniach, D. and Roitt, I.M.** (1962). Auto-antibodies in disease[1,2]. *Ann. Rev. Med.,* **13,** 213.

5 **Doniach, D. and Roitt, I.M.** (1976). *Clinical aspects of immunology 3rd edition,* ed. P.G.H. Gell, R.R.A. Coombs and P.J. Lachmann, Blackwell, Oxford.

6 **Roitt, I.M., Doniach, D.,** *et al* (1956). Auto-antibodies in Hashimoto's disease (lymphadenoid goitre). *Lancet,* ii, 820.

7 **Vallée, G., Izembart, M.** *et al* (1982). Étude de la fréquence des anticorps antithyroglobuline et antimicrosomaux en pathologie thyroïdienne. *Ann. Biol. Clin.,* **40,** 651-656.

8 **Witebsky, E. and Rose, N.R.** (1956). Studies on organ specificity. I.V production of rabbit thyroid antibodies in the rabbit. *J. Immunol.,* 76, 408.

9 **Witebsky, E., Rose, N.R.,** *et al* (1957). Chronic thyroiditis and autoimmunization. *J. Amer. med. Ass.,* 164, 1439.

10 Données sur fichier.

EMBALLAGE

REF AD12/R30850601..50 tests

Légende des symboles

REF	Référence de catalogue
IVD	Dispositif médical de diagnostic *in vitro*
	Consulter le mode d'emploi
	Limite de température (température de conservation)
LOT	Code de lot (numéro de lot)
	A utiliser avant (date de péremption)
	Avertissement, consulter la documentation jointe
	fabricant



*Marque commerciale

X7812, Août 2012 révisé



Remel Europe Ltd
Clipper Boulevard West, Crossways
Dartford, Kent, DA2 6PT
Royaume-Uni

Pour tout support technique, contacter le distributeur local.